

24. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

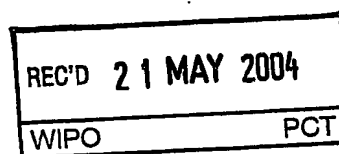
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 2 7 3 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 8 2 7 3 9]

出 願 人 アークレイ株式会社
Applicant(s): ユニチカ株式会社

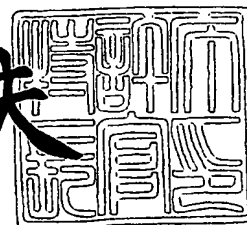


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0276

【提出日】 平成15年 3月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/04

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素の製造法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社内

【氏名】 山岡 秀亮

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社内

【氏名】 星島 光博

【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市宇治小桜 2 3 番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

【氏名】 川瀬 至道

【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市宇治小桜 2 3 番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

【氏名】 黒坂 啓介

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000004503

【氏名又は名称】 ユニチカ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 192372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードする DNA が発現可能な形態で導入され、かつ、c c m 系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌。

【請求項 2】 α サブユニットをコードする DNA が β サブユニットをコードする DNA の上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御される請求項 1 に記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 3】 さらに、前記グルコース脱水素酵素の γ サブユニットをコードする DNA が発現可能な形態で導入された請求項 1 に記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 4】 γ サブユニットをコードする DNA が α サブユニットをコードする DNA の上流に位置する請求項 3 に記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 5】 前記エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリである請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードする DNA を発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) のグルコース脱水素酵素複合体を大量発現するエシェリヒア属細菌、及び酵素複合体の製造方法に関する。グルコース脱水素酵素は、酵素電極を用いたグルコースセンサ等に有用である。

【0002】

【従来の技術】

グルコース脱水素酵素として、ブルクホルデリア属の微生物（ブルクホルデリア・セバシア（*Burkholderia cepacia*）KS1株）が産生する酵素が知られている。同酵素は、触媒サブユニットである α サブユニット、チトクロームCである β サブユニット、及び γ サブユニットからなる複合体であり、熱安定性が高く、反応に溶存酸素の影響を受けにくい等の優れた性質を有している。同酵素の α サブユニット及び γ サブユニットをコードするDNAが単離され、 β サブユニットをコードするDNAの一部も単離された。また、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）での発現に成功している（以上、特許文献1参照）。しかしながら、発現されたGDHは β サブユニットを持たないものと考えられる。

【0003】

ところで、エシェリヒア・コリのチトクローム成熟系として、*c c m*系（cytochrome C maturation system）が知られている。*c c m*系は、エシェリヒア・コリにおいて、嫌気下、かつ、特殊な条件下で発現することが知られている（非特許文献1）。*c c m*系をコードするオペロン（*c c m A B C D E F G H*）のDNA配列は既に明らかになっている（非特許文献2、3）。さらに、*c c m*系を発現するプラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリにおいて、異種生物由来の共有結合型マルチヘムチトクロームを好気下で発現、生産させたことが報告されている（非特許文献4～7）。

【0004】

また、*c c m*オペロンを含むプラスミドとして、同オペロンをpACYC184に挿入して得られたプラスミドpEC86（非特許文献8）が知られている。

【0005】

【特許文献1】

国際公開第02/36779号パンフレット

【非特許文献1】

J. Bacteriol. 177, 4321-4326 (1995)

【非特許文献2】

Nature 409 (6819), 529-533 (2001)

【非特許文献3】

GeneBank database accession U0008 (1993)

【非特許文献 4】

Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 744-7 (1998)

【非特許文献 5】

Biochim. Biophys. Acta, 1411, 114-20 (1999)

【非特許文献 6】

Biochim. Biophys. Acta, 1481, 18-24 (2000)

【非特許文献 7】

Protein Sci 9, 2074-84 (2000)

【非特許文献 8】

Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 744-7 (1998)

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、エシェリヒア・コリにおいて、前記グルコース脱水素酵素の α サブユニットのみを発現させた場合に比べて、 α サブユニットと β サブユニットを同時に発現させた場合はその効率が低いことを見出している。本発明は、 α サブユニットと β サブユニットを含む酵素複合体を、エシェリヒア属細菌で大量発現させる手段を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、エシェリヒア属細菌において、ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素複合体をコードする DNA の発現が、同細菌の c c m 系の発現を増強することによって高めることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードする DNA が発現可能な形態で導入され、かつ、c c m 系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌。

(2) α サブユニットをコードする DNA が β サブユニットをコードする DNA の上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御される (1) に記載のエシェリヒア属細菌。

(3) さらに、前記グルコース脱水素酵素の γ サブユニットをコードする DNA が発現可能な形態で導入された (1) に記載のエシェリヒア属細菌。

(4) γ サブユニットをコードする DNA が α サブユニットをコードする DNA の上流に位置する (3) に記載のエシェリヒア属細菌。

(5) 前記エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリである (1) ~ (4) のいずれかに記載のエシェリヒア属細菌。

(6) (1) ~ (5) のいずれかに記載のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードする DNA を発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のエシェリヒア属細菌は、ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素（以下、単に「GDH」ともいう）の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードする DNA（以下、各々「 α サブユニット遺伝子」及び「 β サブユニット遺伝子」ということがある）が発現可能な形態で導入され、かつ、c c m 系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌である。

【0010】

前記エシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリが挙げられる。

また、前記ブルクホルデリア・セパシアとしては、KS1 株、JCM2800 株、JCM2801 株、又は J2315 株等が挙げられる。KS1 株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に受託番号 FERM BP-7306 として寄託されている。JCM2800 株又は JCM2801 株は、理化学研究所微生物系統保存施設（Japan Collection of Microorganisms, JCM）から入手するこ

とができる。また、J 2315株は、American Type Culture Collection (ATCC) にATCC番号BAA-245として、The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM)に菌株番号LNG 16656として寄託されており、これらから入手することができる。

【0011】

K S 1株のGDH α サブユニット遺伝子、及び β サブユニット遺伝子の一部を含む染色体DNA断片の塩基配列を配列番号1に示す(WO 02/36779号パンフレット参照)。この塩基配列には3つのオープンリーディングフレーム(ORF)が存在し、5'末端側から2番目及び3番目のORFは、それぞれ α サブユニット(配列番号2)、及び β サブユニット(配列番号3)をコードしている。また、1番目のORFは γ サブユニット(配列番号2)をコードしていると推定される。また、配列番号9に、 β サブユニット遺伝子全長を含む断片の塩基配列を示す。さらに、 β サブユニットのアミノ酸配列を配列番号10に示す。配列番号10において、アミノ酸番号1~22はシグナルペプチドであると推定される。尚、配列番号9及び10において、第1番目のアミノ酸残基はValと記載されているが、Metである可能性が高く、また、翻訳後に脱落している可能性がある。

【0012】

本発明に用いる α サブユニット遺伝子は、配列番号3に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子に限られず、コードされるポリペプチドがGDH活性を有する限り、配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであってもよい。尚、配列番号3には、配列番号1の塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示してあるが、N末端のメチオニン残基は、翻訳後に脱落している可能性がある。前記「1又は複数」とは、好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個、特に好ましくは1~3個である。

【0013】

また、 β サブユニット遺伝子は、GDHの β サブユニットとして機能し得る限り、配列番号10のアミノ酸番号23~425からなるアミノ酸配列において、1

又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであってもよい。前記「1又は複数」とは、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、特に好ましくは1～5個である。尚、GDHの β サブユニットとして機能するとは、GDHの酵素活性を損なわずにチトクロームCとして機能することをいう。

【0014】

α サブユニット遺伝子として具体的には、配列番号1の塩基番号764～2380からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また、 α サブユニット遺伝子は、配列番号1の塩基配列の塩基番号764～2380からなる塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、GDH活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

【0015】

また、 β サブユニット遺伝子として具体的には、配列番号9の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また β サブユニット遺伝子は、配列番号9の塩基番号187～1398からなる塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 β サブユニットとして機能し得るタンパク質をコードするDNAであってもよい。

【0016】

前記ストリンジェントな条件としては、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズする条件、具体的には、1×SSC、0.1%SDS、60℃が挙げられる。

【0017】

α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子は、例えば、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。PCR用プライマーは、前記の塩基配列に基づいて化学合成することによって調製することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、ブルクホルデリア・セパ

シアKS1株の染色体DNAから取得することもできる。また、ブルクホルデリア・セバシアの他の菌株からも、同様にしてバリエーションを取得することができる。

【0018】

本発明においては、 α サブユニット遺伝子は β サブユニット遺伝子上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御されることが好ましい。

また、 α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子とともに、 γ サブユニットをコードするDNA（ γ サブユニット遺伝子）が発現可能な形態でエシェリヒア属細菌に導入されることが好ましい。その際、 γ サブユニット遺伝子は、 α サブユニット遺伝子上流に位置し、単一のプロモーターによって各サブユニット遺伝子の発現が制御されることが好ましい。

【0019】

γ サブユニット、 α サブユニット及び β サブユニットをこの順にコードするポリシストロニックなDNA断片は、例えば、ブルクホルデリア・セバシアKS1株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号12、13の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRによって取得することができる（後記実施例参照）。

【0020】

α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子（必要に応じて γ サブユニット遺伝子）を含むDNA（以下、「GDH $\alpha\beta$ 遺伝子」という）を発現可能な形態でエシェリヒア属細菌に導入するには、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子をエシェリヒア属細菌で機能するベクターに挿入し、得られた組換えベクターでエシェリヒア属細菌を形質転換すればよい。その際、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子上流にエシェリヒア属細菌で機能するプロモーターを配置することによって、同プロモーターの制御下でGDH $\alpha\beta$ 遺伝子が発現させることができる。

【0021】

前記エシェリヒア属細菌で機能するベクターとしては、例えば、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pACYC184、pBBR122等が挙げられる。また、前記プロモーターとしては、例えばlac、trp、tac、trc、P_L、tet、PhoA等が挙げられ

る。また、プロモーターを含む発現ベクターの適当な部位に、GDH α β 遺伝子を挿入することによって、同遺伝子のベクターへの挿入とプロモーターの連結とを同じ工程で行うことができる。このような発現ベクターとしては、pTrc99A、pBluescript、pKK223-3等が挙げられる。

【0022】

また、GDH α β 遺伝子は、発現可能な形態でエシェリヒア属細菌の染色体DNA中に組み込まれてもよい。

組換えベクターでエシェリヒア属細菌を形質転換するには、例えばカルシウム処理によるコンピテントセル法又はエレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0023】

本発明のエシェリヒア属細菌は、上記のようにしてGDH α β 遺伝子が導入され、かつ、ccm系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌である。

ccm系は、ccmオペロン(ccmA B C D E F G H)によってコードされている。ccmオペロンは、例えば、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。PCR用プライマーは、報告されている塩基配列(DDBJ/EMBL/GenBank ACCESSION AE005452)に基づいて合成することによって調製することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、エシェリヒア・コリの染色体DNAから取得することもできる。また、他のエシェリヒア属細菌からも、同様にしてバリエーションを取得することができる。

【0024】

ccmオペロンとしては、前記の報告されている塩基配列を有するDNAの他、同塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ccm系をとして機能する酵素群をコードするDNAであってもよい。

【0025】

ccm系は、嫌気下、かつ、特殊な条件下で発現することが知られている(非特許文献1)。本発明において、「ccm系の発現が増強された」とは、エシェリヒア属細菌の野生株又は非改変株よりも発現量が高められたか、又は、嫌気下

、かつ、特殊な条件下でなくても発現するように改変されたことをいう。嫌気下、かつ、特殊な条件下ではない条件としては、好気性条件下が挙げられる。

【0026】

c c m系の発現を増強するには、c c mオペロンの各遺伝子を、構成的に発現するプロモーター、又は発現制御が可能なプロモーターに連結し、得られた組換え遺伝子をエシェリヒア属細菌に導入すればよい。好適なプロモーター及びベクター、並びにエシェリヒア属細菌へのc c mオペロンの導入は、前記GDH α β 遺伝子について記載したのと同様である。

【0027】

c c mオペロンを含むプラスミドとして、同オペロンがp A C Y C 1 8 4に挿入して得られたp E C 8 6が挙げられる。同オペロンは、t e tプロモーターの制御下で構成的に発現する。また、エシェリヒア属細菌の染色体DNA上のc c mオペロンをP C R等によりクローニングし、適当なプロモーターの支配下に挿入したプラスミドを作製することもできる。

【0028】

また、エシェリヒア属細菌の染色体DNA上のc c mオペロンのプロモーターを、適当なプロモーターに置換することによっても、同オペロンの発現を増強することができる。

【0029】

本発明のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子を発現させ、これらの発現産物としてGDH酵素複合体を産生させ、これを採取することにより、GDH複合体を効率よく製造することができる。ここで、「GDH複合体」とは、好ましくは各サブユニットが会合して多量体タンパク質を形成しているものをいうが、遊離した各サブユニットの混合物も含まれる。

【0030】

エシェリヒア属細菌の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

【0031】

培地の栄養源としては、エシェリヒア属細菌の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0032】

培養温度は、エシェリヒア属細菌が生育し、GDH複合体を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDH複合体が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12~72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、GDH複合体を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0~9.0程度の範囲である。

【0033】

GDH複合体は、培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、GDH複合体が培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、GDH複合体を含有する溶液とエシェリヒア属細菌菌体と分離した後に利用される。GDH複合体が菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加して各サブユニットを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0034】

上記のようにして得られたGDH複合体含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イ

オン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製を行うことにより、精製されたGDH複合体を得ることができる。カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。

【0035】

尚、GDHは α サブユニット単独でも酵素活性を示す。したがって、本発明のエシェリヒア属細菌又はGDH複合体から、 α サブユニットのみを単離、精製して使用することもできる。

【0036】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【実施例1】ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットの検索

Sanger Centre のブルクホルデリア・セパシアJ2315株ゲノムデータベース(<http://www.sanger.ac.uk/>)を用いて、KS1株由来GDHの β サブユニット遺伝子を検索した。すでに明らかにされているKS1株GDH β サブユニットのN末端配列(配列番号5)を参考に、アセトバクター S p.、グルコノバクター S p. 由来のアルコール脱水素酵素 (Tamaki T. et al., Biochim Biophys Acta 1088(2):292-300 (1991)、Matsushita K., et al., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 304-310 (1992)、Takemura H., et al., J Bacteriol, 175, 6857-66 (1993)、Kondo K. et al., Appl Environ Microbiol, 63, 1131-8 (1997))、エルビニア s p.、シュードモナス s p. 由来のグルコン酸脱水素酵素 (Yum DY, et al., J Bacteriol, 179, 6566-72, (1997)、Matsushita K. et al., J Biochem, 85, 1173-81 (1979))、グルコノバイター s p. 由来のソルビトール脱水素酵素 (Choi, E.S., et al., FEMS Microbiol. Lett., 125, 45-50 (1995))、エルビニア s p.、パントエア s p. 由来の2-ケトグルコン酸脱水素酵素 (Pujol CJ et al., J Bacteriol, 182, 2230-7, (2000)) のチトクロム c サブユニットとホモロジーの高いアミノ酸配列(配列番号6)をデザインした。

【0037】

上記アミノ酸配列を指標として、前記ブルクホルデリア・セパシアJ2315株のデータベースからBLASTを用いてホモロジーの高いアミノ酸配列をコードしている遺伝子配列を検索した。つぎに、得られた5つの配列に対して、KS1株GDH α サブユニットのC末端配列とのホモロジーを検索した結果、2つの遺伝子断片から翻訳されるアミノ酸配列が高いホモロジー (>90%) を示した。各遺伝子断片は200～500bpと短かったため、これらの配列に対して相同性の高い配列を、Blastを用いてブルクホルデリア・セパシアJ2315株のゲノムデータベースから検索し、各断片をつなぎ合わせた。その結果、3110bpの断片を得た。得られた塩基配列にはGDHのC末端と思われるORFと1275bpからなるチトクローム c 構造遺伝子と思われるORFが存在した。得られたJ2315株の塩基配列と既にクローニングされているKS1株 α サブユニット塩基配列を比較した結果、 α サブユニット下流にはJ2315株チトクローム c のシグナルペプチドをコードする塩基配列に相同性の高い塩基配列が含まれていた。

以上のことから、すでにクローニングされているブルクホルデリア・セパシアKS1株のGDH遺伝子（配列番号1、WO 02/36779号パンフレット参照）の三番目のORF（配列番号1の塩基番号2386以降）は、 β -サブユニットをコードしていると推定された。また、精製された β -サブユニットのN末端におけるアミノ酸配列と、配列番号1中の塩基番号2452～2466の塩基配列によって翻訳される5アミノ酸残基が一致したことから、前記ORFは β サブユニットをコードしていると考えられた。

【0038】

<2>インバースPCR法を用いた β サブユニット構造遺伝子の増幅

(1) 菌体の培養及びゲノムの抽出

KS1株を5mlの完全培地（0.5% polypepton、0.3% yeast extract、0.5% NaCl）を用いて37℃で一晩振とう培養した。得られた菌体からGennomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いてゲノムを抽出した。方法は付属のマニュアルに従った。得られたゲノムに対してフェノール/クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿させた後、精製水に溶解し

た。

【0039】

(2) ゲノム断片の環状化

KS1株より抽出したゲノムを、BamHI、EcoRI、HindIII、SmaI、SacIおよびXhoIで消化し、エタノール沈殿によってゲノム断片を回収した。制限酵素消化したゲノム1 μ gをDNAライゲーションキット（宝酒造(株)）を用いて16℃で一晩ライゲーション反応を行った。

【0040】

(3) P C R

KS1株GDH β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたフォワードプライマー（EF1配列番号7）50pmol、リバープライマー（ER1配列番号8）50pmol（プライマーはいずれもInvitrogen社に依頼合成）、LATAq（宝バイオ（株））0.5ml、dNTP溶液 8 μ l、10 \times PCR buffer 5 μ lに精製水を全量50 μ lとなるように加え、プログラムテンプコントロールシステム PC-801（ASTE C）を用いてPCRを行った。PCRの反応は、以下の条件で行った。94℃ 5分、98℃ 20秒、62℃ 30秒を30サイクルの後、72℃ 6分、72℃ 10分。

【0041】

SmaIで制限酵素消化したゲノムをテンプレートとした場合において、約2.1kbpの大きさの断片がアガロース電気泳動で確認された。

【0042】

< 3 > PCR増幅断片のシーケンシング

(1) T A クローニング

前記のインバース P C R 産物をアガロースゲル電気泳動後、バンドを切り出し、Gene clean II KIT（Bio101 inc.）を用いて精製した。この断片を、pGEMR-T and pGEMR-T EASY Vector Systems（Promega）を用いて、pGEM-T Vectorにライゲーションした。ライゲーションを行ったベクターでエシェリヒア・コリDH5 α を形質転換し、アンピシリン 50 μ g/ml、X-Gal 40 μ g/ml、IPTG 0.1 μ Mを含むL寒天培地を用いて一晩培養した。出現したコロニーから白色のコロニーを選択し、アンピシリン50 μ g/mlを含むL培地で一晩培養して、菌体からプラスドをアル

カリ法により抽出した。

【0043】

(2) シークエンスサンプルの調製

得られたプラスミドをRNase処理し、これに0.6倍量の20% PEG6000/2.5M NaClを加え、氷上に1時間放置した。その後15000r.p.m、4℃で15分間遠心分離し、ペレットを得た。これを70%エタノールで洗浄し、ペレットを真空乾燥させた。これを精製水に溶解した。

【0044】

(3) DNA塩基配列の解析

(2) で得られたプラスミドの挿入断片の塩基配列を、ABI PRISMTM310 Genetic Analyzer (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)を用いて解析した。ベクターのマルチクローニングサイトからM13プライマーを用いて挿入断片の一部の配列を決定した結果、これまでに解析されている β サブユニットN末端を含む塩基配列が確認された。この配列を手がかりにプライマーを順次作製して用い、挿入断片の塩基配列を決定した。結果を配列番号9に示す。また、この塩基配列に含まれるORFがコードするアミノ酸配列を配列番号10に示す。

【0045】

β サブユニットは、全部で425個のアミノ酸残基から構成されており、すでに得られているN末端アミノ酸配列と比較して、そのうち22残基はシグナルペプチドであると考えらる。アミノ酸配列から計算される分子量は45,276Daであり、シグナルペプチドを除いた分子量42,731Daは、SDS-PAGEから求められたKS1株GDH β サブユニットの分子量43kDaとほぼ同等の値であった。 β サブユニットのアミノ酸配列中には、チトクロームcにおいてヘムとの結合モチーフ(配列番号11)が3ヶ所に確認された。このORFは α サブユニット構造遺伝子のORFのすぐ下流に位置し、開始コドンの上流にSD配列と思われる配列が存在した。

【0046】

得られたアミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のチトクロームcサブユニットと65%、グルコノバクター・オ

キシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のチトクローム c サブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedii*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のチトクローム c サブユニットと44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来 2-ケートーグルコン酸脱水素酵素のチトクローム c サブユニットとアミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同性を示していた。またこれらのチトクローム c のアミノ酸配列中には、ヘム結合モチーフ (配列番号11) 配列が保存されていた。

尚、KS1株のGDH β サブユニット構造遺伝子は、J2315株のGDH β サブユニット構造遺伝子と、塩基配列レベルで92.0%、アミノ酸レベルで92.2%の相同性を有している。

【0047】

【実施例2】 エシェリヒア・コリへのGDH α β 遺伝子の導入及び c c m系の増強

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株からの染色体DNAの調製

ブルクホルデリア・セパシア KS1株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をTL液体培地(ポリペプトン 10g、酵母抽出液 1g、NaCl 5g、KH₂PO₄ 2g、グルコース 5g; 1L、pH 7.2)を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 μ g/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノールクロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

【0048】

<2>GDH α β 遺伝子の調製

前記染色体DNAを鋳型として、以下の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRにより、GDHの γ サブユニット、 α サブユニット及び β サブユニットをコードするDNA断片を増幅した。

【0049】

<フォワードプライマー: cF1>

5'-CATGCCATGGCACACAACGACAACAC-3' (配列番号 12)

<リバースプライマー: GDHbU1>

5'-GTCGACGATCTTCTTCCAGCCGAACATCAC-3' (配列番号 13)

【0050】

増幅した断片のC末端側を平滑末端化した後、N末端側をNcoIで消化し、同様に処理したpTrc99A (Pharmacia社) にライゲーションした。得られた組換えベクターでE. coli DH5 α を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mLを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。得られた形質転換体を液体のLB培地で培養してプラスミドを抽出し、その挿入DNA断片を解析したところ、約3.8kbの挿入断片が確認された。本プラスミドをpTrc99A γ α β と命名した。本プラスミド中のGDH α β 遺伝子は、trcプロモーターによって制御される。pTrc99A γ α β は、アンピシリン耐性遺伝子を保持している。

【0051】

<3>c c m系プラスミドの調製

pTrc99A γ α β をEcoT221で消化した後に末端を平滑化した。次にNotIで消化して、アガロースゲル電気泳動により短いDNA断片を分離、回収した。このDNA断片をScaIとNotIで消化したpBBR122 (MoBiTec社) に挿入して、pBBGDH γ α β を作製した。

【0052】

E. coli JM109より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をLB培地 (ポリペプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 10g; 1L、pH7.0) を用いて37℃で一夜振盪培養した。増殖した菌体を遠心分離により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 μ g/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノール-クロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重ねて中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてす

くい取り、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、JM109染色体DNA溶液とした。

【0053】

JM109染色体DNAを鋳型として、以下に配列を示すオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRにより c c m系遺伝子をコードするDNA断片を増幅した。

【0054】

<フォワードプライマー: ECccmD1>

5'- TGGCCATGGTTGAAGCCAGAGAGTTACTTT -3' (配列番号 14)

<リバープライマー: ECccmU1>

5'- TTATTTACTCTCCTGCGGCGACAAATGTTG -3' (配列番号 15)

【0055】

増幅した末端を平滑化した後、N末端側をNcoIで消化した。この断片をACCIで消化、平滑末端化した後、NcoIで消化したpBBGDH γ α β とライゲーションしてpBBJMccmを作製した。尚、pBBGDH γ α β をNcoIで消化することにより、GDH α β 遺伝子は削除されている。

【0056】

<4>GDH α β 遺伝子及び c c m系のエシェリヒア・コリへの導入

E. coli JM109をpTrc99A γ α β 及びpBBJMccmで形質転換し、JM109/pTrc99A γ α β , pBBJMccmを得た。また、コントロールとしてpTrc99A γ α β でE. coli JM109を形質転換したJM109/pTrc99A γ α β を得た。

これらの形質転換体を50 μ g/mlアンピシリンと50 μ g/mlカナマイシン (JM109/pTrc99A γ α β , pBBJMccm)、または50 μ g/mlアンピシリン (JM109/pTrc99A γ α β) を含む10mLの2 \times YT培地で34 $^{\circ}$ C、1夜振盪培養した。また、ブルクホルデリア・セパシアKS1株を10mLの完全培地で1夜振盪培養した。培養液の一部から遠心分離により各菌体を回収し、遠心分離前の液量になるように1%コール酸ナトリウムを含む10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) を加えた後に超音波により細胞を破碎した。次に、破碎液を遠心分離した上清中のGDH活性を測定した。

【0057】

GDH活性は次の操作にて測定した。47mM リン酸緩衝液pH6.0、20mM グルコース

、2mM フェナジンメトサルフェート、0.1mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを、37℃で予め加温した後にサンプルを加えて反応を開始し、37℃に保ち、600nmの吸光度変化を測定して求めた。GDH活性は、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの分子吸光係数4.76mM/cmを用いて、酵素1単位 (U) は1分毎に1 μ モルの2,6-ジクロロフェノールインドフェノールが酸化される量と定義して求めた。

結果は、JM109/pTrc99A γ α β 、ブルクホルデリア・セバシアKS1、JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccmのGDH活性は、それぞれ、0.3U/mL、1.4U/mL、32U/mLであった。すなわち、JM109/pTrc99A γ α β にはGDH活性がほとんど認められず、野生株であるブルクホルデリア・セバシアKS1にはGDH活性がわずかであったが、JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccmでは非常に高いGDH活性が認められた。尚、JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccmからGDH複合体を精製し、SDS-PAGEを行ったところ、KS1株から精製したGDH複合体と同様の泳動パターンを示すことが確認できた(図1)。

【0058】

【発明の効果】

本発明により、ブルクホルデリア・セバシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニットと β サブユニットを含む酵素複合体を、エシェリヒア属細菌で大量発現させることができる。

【0059】

【課題を解決するための手段】


【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Arkray, Inc.

Unitika Ltd.

<120> グルコース脱水素酵素の製造法



<130> P-B0276

<141> 2003-03-25

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2467

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (258)..(761)

<220>

<221> CDS

<222> (764)..(2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386)..(2466)

<400> 1

aagcttttctg tttgattgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120
tacgaatggc tgacacattg aatggactat aaaaccattg tccgttccgg aatgtgcgcg 180

tacatttcag gtccgcgccg atttttgaga aatatcaagc gtggttttcc cgaatccggt 240
 gttcgagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tcg cgt cgc 290
 Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg
 1 5 10
 cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa 338
 His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln
 15 20 25
 ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg 386
 Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu
 30 35 40
 cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg 434
 Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met
 45 50 55
 acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc 482
 Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile
 60 65 70 75
 ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc 530
 Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala
 80 85 90
 gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg 578
 Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr
 95 100 105
 cct gaa cag gaa tcg ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc 626
 Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu
 110 115 120
 ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc 674
 Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe
 125 130 135
 ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tcg tat tgc ccc aac aaa 722

Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys
 140 145 150 155
 ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc 769
 Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala
 160 165 170
 gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tcg ggt gtc 817
 Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val
 175 180 185
 gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg 865
 Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val
 190 195 200
 atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag 913
 Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu
 205 210 215
 cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg 961
 Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro
 220 225 230
 tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac 1009
 Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr
 235 240 245 250
 ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg 1057
 Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala
 255 260 265
 gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att 1105
 Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile
 270 275 280
 ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg 1153
 Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp
 285 290 295

ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa 1201
 Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu
 300 305 310
 gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg 1249
 Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro
 315 320 325 330
 cgc aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag 1297
 Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu
 335 340 345
 cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc 1345
 Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val
 350 355 360
 gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc cgc ccg 1393
 Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro
 365 370 375
 act tgt tgc ggc aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg 1441
 Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala
 380 385 390
 atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg 1489
 Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala
 395 400 405 410
 aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac 1537
 Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly Pro Asp
 415 420 425
 aag cgc atc gtc gcg gcg ctc tac aag gac aag acg ggc gcc gag cat 1585
 Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala Glu His
 430 435 440
 cgc gtc gaa ggc aag tat ttc gtg ctc gcc gcg aac ggc atc gag acg 1633
 Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr

445	450	455	
ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac ggt gtc			1681
Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn Gly Val			
460	465	470	
gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc			1729
Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly			
475	480	485	490
acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc			1777
Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly			
495	500	505	
ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc			1825
Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg			
510	515	520	
gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc			1873
Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile			
525	530	535	
gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc			1921
Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro			
540	545	550	
gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag			1969
Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln			
555	560	565	570
ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg			2017
Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val			
575	580	585	
ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc			2065
Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile			
590	595	600	
acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gcg cat acg cgc			2113

Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg
605 610 615
gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg 2161
Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val
620 625 630
ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc 2209
Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile
635 640 645 650
atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg 2257
Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr
655 660 665
ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg agc agc gcg acg atg ccg acc 2305
Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr
670 675 680
gtc ggt acc gta aac gtg acg ctg acg atc gcc gcg ctc gcg ctg cgg 2353
Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg
685 690 695
atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tgacc gtg cgg aaa tct act ctc 2403
Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu
700 705 710
act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451
Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala
715 720 725
gcc gat gcg gcc gat c 2467
Ala Asp Ala Ala Asp
730

<210> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 2

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala
1 5 10 15
Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu
20 25 30
Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp
35 40 45
Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser
50 55 60
Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu
65 70 75 80
Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln
85 90 95
Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser
100 105 110
Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn
115 120 125
Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp
130 135 140
Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala
145 150 155 160
Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala
165

<210> 3

<211> 539

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 3

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45
 Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80
 Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95
 Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125
 Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175
 Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190
 His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
 195 200 205

Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
 210 215 220
 Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
 245 250 255
 Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
 260 265 270
 Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
 275 280 285
 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
 290 295 300
 Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
 305 310 315 320
 Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly
 325 330 335
 Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
 340 345 350
 Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser
 355 360 365
 Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met
 370 375 380
 Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr
 385 390 395 400
 Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg
 405 410 415
 Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro
 420 425 430
 Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His

435 440 445
 Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp
 450 455 460
 Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser
 465 470 475 480
 Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
 485 490 495
 Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met
 500 505 510
 Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
 515 520 525
 Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
 530 535

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp
 20 25

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 5

Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala

1

5

10

15

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus

<220>

<221> UNSURE

<222> (6, 17, 18, 19, 22)

<223> Xaa=unknown

<400> 6

Ala Asp Ala Ala Asp Xaa Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Asp Cys Xaa Ala Cys His

20

25

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

tgcaccgtgc ggaaatctac tctcact

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

acttccttct tcagcgtgtc cgacatc

27

<210> 9

<211> 1441

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (121)..(1398)

<400> 9

tccgaacctg ttcatttcga gcagcgcgac gatgccgacc gtcggtaccg taaacgtgac 60
gctgacgata gccgcgctcg cgctgcggat gtcggacacg ctgaagaagg aagtctgacc 120

gtg cgg aaa tct act ctc act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg 168
 Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 ccg ggc ttc gcg cgc gcg gcc gat gcg gcc gat ccg gcg ctg gtc aag 216
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
 20 25 30
 cgc ggc gaa tac ctc gcg acc gcc atg ccg gta ccg atg ctc ggc aag 264
 Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys
 35 40 45
 atc tac acg agc aac atc acg ccc gat ccc gat acg ggc gac tgc atg 312
 Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met
 50 55 60
 gcc tgc cac acc gtg aag ggc ggc aag ccg tac gcg ggc ggc ctt ggc 360
 Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 ggc atc ggc aaa tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg gtg cgg cac 408
 Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
 85 90 95
 ggc gtg tcg aag aac ggc gac aac ctg tat ccg gcg atg ccg tac gtg 456
 Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
 100 105 110
 tcg tac gcg aag atc aag gac gac gac gta cgc gcg ctg tac gcc tac 504
 Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
 115 120 125
 ttc atg cac ggc gtc gag ccg gtc aag cag gcg ccg ccg aag aac gag 552
 Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
 130 135 140
 atc cca gcg ctg cta agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg 600
 Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp

145 150 155 160
 ctg ttc ctg aag gac ggc ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc 648
 Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala
 165 170 175
 gaa tgg aat cgc ggc gcg tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc 696
 Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
 180 185 190
 acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac 744
 Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
 195 200 205
 gaa acc ggc ggc agc ttc ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac 792
 Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
 210 215 220
 ggc tac aac atc acg tcg gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg 840
 Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr
 225 230 235 240
 cag cag cag ctc gtg cag tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc 888
 Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val
 245 250 255
 gcg cag gcg gcc ggg ccg atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg 936
 Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser
 260 265 270
 aag atg acc gaa gcg gac atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg 984
 Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr
 275 280 285
 gtg ccg gcc gtt gcc gac agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg 1032
 Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp
 290 295 300
 ggc aag ccg gcc gag gac ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg 1080

Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 tcg tcg ggc atc gat ccg gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg 1128
 Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
 325 330 335
 tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tcg 1176
 Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser
 340 345 350
 ctg ttc cac aac tcc acc gtc ggc gcg tcg aat ccg tcg aac ctc gtg 1224
 Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val
 355 360 365
 cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc 1272
 Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
 370 375 380
 ggg atg ccc gct ttc cgc tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg 1320
 Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 ctg acg aac tac gtg acc gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg 1368
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 acg gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga catagtcggg cgcgccgaca 1418
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425
 cggcgcaacc gataggacag gag 1441

<210> 10

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 10

Val	Arg	Lys	Ser	Thr	Leu	Thr	Phe	Leu	Ile	Ala	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15	
Pro	Gly	Phe	Ala	Arg	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Arg	Gly	Glu	Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala	Met	Pro	Val	Pro	Met	Leu	Gly	Lys
			35					40					45		
Ile	Tyr	Thr	Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Asp	Pro	Asp	Thr	Gly	Asp	Cys	Met
	50					55						60			
Ala	Cys	His	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Tyr	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly
65					70					75				80	
Gly	Ile	Gly	Lys	Trp	Thr	Phe	Glu	Asp	Phe	Glu	Arg	Ala	Val	Arg	His
				85					90					95	
Gly	Val	Ser	Lys	Asn	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Pro	Ala	Met	Pro	Tyr	Val
			100					105						110	
Ser	Tyr	Ala	Lys	Ile	Lys	Asp	Asp	Asp	Val	Arg	Ala	Leu	Tyr	Ala	Tyr
			115					120						125	
Phe	Met	His	Gly	Val	Glu	Pro	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Lys	Asn	Glu
	130						135						140		
Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Ser	Met	Arg	Trp	Pro	Leu	Lys	Ile	Trp	Asn	Trp
145					150					155				160	
Leu	Phe	Leu	Lys	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gln	Pro	Lys	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala
				165					170					175	
Glu	Trp	Asn	Arg	Gly	Ala	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Leu	Ala	His	Cys	Ser
		180						185					190		
Thr	Cys	His	Thr	Pro	Arg	Gly	Ile	Ala	Met	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Asp
		195					200						205		
Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Ala	Gly	Trp	Asp

210 215 220
 Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr
 225 230 235 240
 Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val
 245 250 255
 Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser
 260 265 270
 Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr
 275 280 285
 Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp
 290 295 300
 Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
 325 330 335
 Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser
 340 345 350
 Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val
 355 360 365
 Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
 370 375 380
 Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: heme binding motif

<220>

<221> UNSURE

<222> (2,3)

<223> Xaa=unknown

<400> 11

Cys Xaa Xaa Cys His

1 5

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

catgccatgg cacacaacga caacac

26

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

gtcgacgatc ttcttccagc cgaacatcac

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

tggccatggt tgaagccaga gagttacttt

30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15

ttatttactc tcctgcggcg acaaatgttg

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ブルクホルデリア・セパシアKS1株及びエシェリヒア・コリJM109/pTrc99A γ α β , pBBJMccmから精製されたGDH複合体のSDS-PAGEの結果を示す図（写真）。

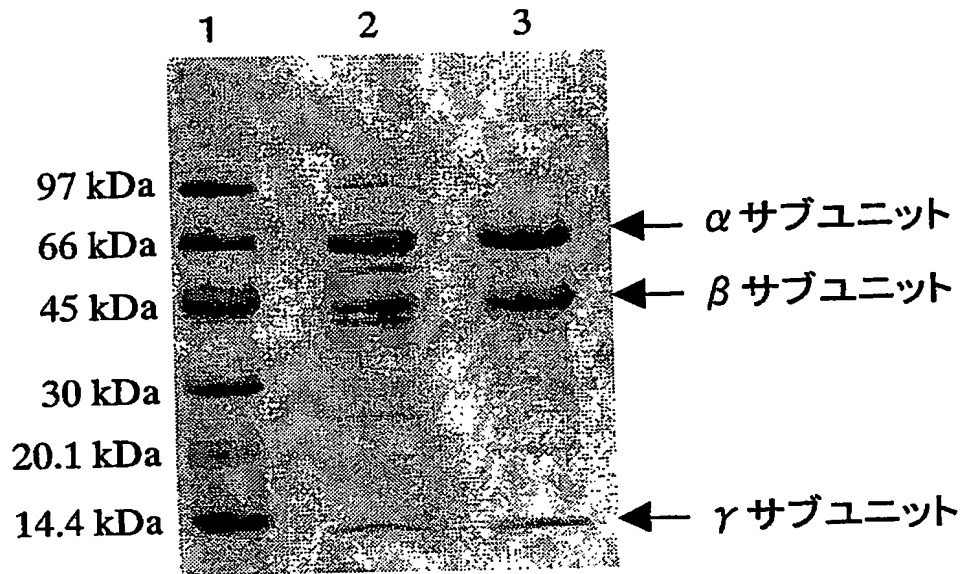
レーン 1：マーカー

レーン 2：KS1株から精製したGDH

レーン 3：JM109/pTrc99A γ α β , pBBJMccmから精製したGDH

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニットと β サブユニットを含む酵素複合体を、エシェリヒア属細菌で大量発現させる。

【解決手段】 ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、c c m系 (cytochrome C maturation system) の発現が增强されたエシェリヒア属細菌を培養して、前記DNAを発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取することにより、グルコース脱水素酵素複合体を製造する。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 0 8 2 7 3 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 4 1 8 9 7]

1. 変更年月日	2 0 0 0 年 6 月 1 2 日
[変更理由]	名称変更
住 所	京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地
氏 名	アークレイ株式会社

特願 2 0 0 3 - 0 8 2 7 3 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 4 5 0 3]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

氏 名

ユニチカ株式会社